

## 原発性非小細胞肺癌切除例における核 DNA 量に 関する基礎的ならびに臨床的研究

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任：岩 喬教授)

林 義 信

(平成3年1月8日受付)

原発性非小細胞肺癌切除例318例を対象に核 DNA 量を測定し、予後との関連を検討した。核 DNA 量はパラフィン包埋ブロック1,525個から得た検体による化プロビジウムによる核染色を行ってフローサイトメトリーにて測定した。腫瘍内多様性による影響を最小限にするために原発巣については最大断面全体から検体を採取した。核 DNA 量は、ヒストグラム上の DNA 指標 (DNA index, DI) にて評価し、DI=1 の二倍体腫瘍 (diploid pattern, D 型) と DI≠1 の異数倍体腫瘍 (aneuploid pattern, A 型) とに分類した。原発巣313例の測定の結果、D 型は78例 (24.9%)、A 型は235例 (75.1%) であった。さらにその転移巣についても同様に測定した結果、原発巣の最大 DI のリンパ節転移巣の最大 DI との相関は全く認めず、原発巣・転移巣間に生物学的相違が高率に存在する可能性が示された。臨床病理学的因子である年齢、性、腫瘍径、術後病期、術後 TNM 因子、組織型、分化度と原発巣の核 DNA 倍体様式との間には、いずれも有意な相関を認めなかった。予後との関連を検討すると、非進行症例では原発巣の核 DNA 量別検討で、D 型群が A 型群に比し有意に予後良好であった。しかし、進行症例では原発巣核 DNA 量は有意な予後因子とはなりえなかった。さらに転移巣の核 DNA 量も考慮した結果、A 型腫瘍巣を認めた症例は原発巣・転移巣とも D 型であった症例より有意に予後不良であった。これらの結果より核 DNA 量測定の臨床応用に際しては原発巣・転移巣双方の測定が不可欠であると考えられた。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析でも、核 DNA 量は独立した予後因子であることが示された。また、再発例についてみると腫瘍巣全体が D 型と判定された群では胸郭内再発が有意に多いのに対し、A 型群では遠隔転移による再発例が多かった。以上より、フローサイトメトリーによる核 DNA 量測定は肺癌の生物学的悪性度の指標として有用であることが示されたが、その正確な測定には原発巣・転移巣間の相違を考慮した上で、より多くの検体採取が必要であると考えられる。

---

**Key words** non-small cell lung cancer, cellular DNA content, heterogeneity, prognostic parameter, multivariate analysis

---

原発性肺癌症例は年々増加の傾向にあり、しかも進行例が多くを占めるためその治療成績は決して満足のいくものではない。各種診断法の進歩による I・II 期例の増加や、進行肺癌に対する積極的手術とその術後管理法の進歩、および免疫化学療法や放射線療法など種々の組合せによる集学的治療の普及などにより、年代毎の手術成績は明らかに向上しているが<sup>1,2)</sup>、最も良

好な成績が期待される I 期例でも、その 5 年生存率は 60~70% と決して満足すべき成績ではなく、消化管癌に比べ明らかに劣っている<sup>3-5)</sup>。これは消化管腫瘍では深達度による進行度評価が可能であるのに対し、肺癌では腫瘍の大きさやリンパ節転移状況が病期分類の主な因子となっており<sup>6)</sup>、いわゆる早期癌の同定が難しいことがその要因と思われる。その結果、腫瘍を構

---

Abbreviations: CV, coefficient of variation; DI, DNA index; PI, propidium iodide; A 型, aneuploid pattern; D 型, diploid pattern; M 型, multiploid pattern; T-A 型, total aneuploid pattern; T-D 型, total diploid pattern; 3 生率, 3 年生存率; 5 生率, 5 年生存率

成する癌細胞個々の悪性度が予後に大きく関与してくる可能性が示唆される。

近年、フロサイトメトリー法の発達にともない、種々の固形癌において細胞内核 DNA 量と腫瘍悪性度の関連を検討した報告が増加している<sup>7-13</sup>。肺癌は同一腫瘍内の異なる部位間や原発巣・転移巣間で、病理組織学的特徴や細胞生物学的悪性度が異なる可能性、すなわち腫瘍内多様性 (heterogeneity) の高い腫瘍であることが知られているにもかかわらず<sup>14-16</sup>、この点に留意した上で核 DNA 量を測定し、予後に及ぼす影響を検討した報告はほとんど見られない<sup>17</sup>。本研究では原発性非小細胞肺癌を対象にその切除標本のパラフィン包埋ブロックより単離した細胞の核 DNA 量を測定し、多様性との関連や予後因子としての意義について検討した。なお、小細胞癌は、生物学的悪性度、治療法および治療予後が非小細胞癌とは大きく異なるため今回の研究対象からは除外した。

## 対象および方法

### I. 対象

1978年1月から1990年8月までに金沢大学医学部第1外科で切除された原発性肺癌661例(小細胞癌を除く)のうち、原発巣の腫瘍最大断面全体および転移巣について十分な検索が可能であった318例を対象とした。年齢は32~82才(平均63.9才)、性別は男性233例、女性85例であった。病理組織型分類では、扁平上皮癌141例、腺癌143例、大細胞癌9例、その他15例で、組織分類、手術所見記載法、病期分類(すべて術後病期とした)は日本肺癌学会取扱い規約<sup>8</sup>によった。他病死は検討より除外した。また、コントロールとしての正常肺および正常リンパ節は対象群中より任意抽出した各15例の非癌正常部および転移陰性リンパ節を使用した。

### II. 方法

#### 1. パラフィン包埋ブロックの選択

切除標本の癌病巣のパラフィン包埋ブロックを用いて癌細胞を分離した。原発巣については各症例とも腫瘍全体を十分反映するよう配慮し、腫瘍最大断面全体を反映するパラフィン包埋ブロック(一例平均3.46個、全1,099個)を使用した。また、転移巣のパラフィン包埋ブロックについては以下のように選択した。すなわち、リンパ節転移巣については肺内・肺門リンパ節群(#10~#14)、上縦隔リンパ節群(右側例#1~#4、左側例#1~#6)、気管分岐部リンパ節(#7)、下縦隔リンパ節(#8、9)およびN<sub>3</sub>リンパ節群<sup>9</sup>の5群に分け、それぞれ転移陽性リンパ節を含むブロックのみに

ついて核 DNA 量を測定した(全287リンパ節群、全408ブロック)。また、同時に切除された肺内転移巣についても15例(18ブロック)核 DNA 量を測定した。

#### 2. 癌細胞の分離

各測定群ともパラフィン包埋ブロックより50μm厚の切片を8~10枚作り、Schutte ら<sup>18</sup>の方法により癌細胞を分散した。すなわち、各1時間ずつ室温下で、キシレン(和光、大阪)にて脱パラフィンを2回行った後、同じく室温下にて、100%、95%、70%、50%エチルアルコール(和光)中で順次30分間ずつ再水和を行った。さらに室温蒸留水中で1時間の再水和後、0.25%トリプシン(SIGMA, St. Louis, U.S.A.)を含むクエン酸バッファー(3mM クエン酸三ナトリウム(和光)、0.1% Nonidet P-40(SIGMA)、1.5mM スペルミン四塩酸塩(SIGMA)、0.5mM トリスアミノメタン(SIGMA)、pH 7.60)中にて37°Cで一昼夜インキュベートした。その後40μmのナイロンメッシュ(NBC工業、大阪)を通し、単離遊離細胞を得た。

#### 3. 核 DNA の染色

核 DNA の染色はよう化プロピジウム(propidium iodide, PI)(Hoechst, Frankfurt, Germany)を用い、Vindeløve ら<sup>19</sup>の方法で行った。すなわち、上記の細胞浮遊液200μlにA液(トリプシン(DIFCO, Detroit, U.S.A.)15mg、クエン酸バッファー500ml)1.5mlを加え、10分間氷冷静置した後、B液(トリプシンインヒビター(SIGMA)250mg、リボヌクレアーゼA(SIGMA)50mg、クエン酸バッファー500ml)1.5mlを加え、さらに10分間氷冷した。さらにその後、C液(PI 208mg、スペルミン四塩酸塩580mg、クエン酸バッファー500ml)1.5mlを加えて約10分間水中で染色した。

#### 4. フローサイトメトリーによる核 DNA 量の測定

核 DNA 量はフローサイトメトリー、FACS-CAN(Becton-Dickinson, New Jersey, U.S.A.)を用いて、DNA 指標(DNA index, DI)として相対的に評価した。染色された細胞を488nmのアルゴンレーザーで励起し、580nmのフィルターを用いて、約20,000個の細胞を測定し、DNA ヒストグラムに表示した。その際、腫瘍内介在正常細胞(リンパ球)や腫瘍周辺正常細胞を内部標準とし、その正常細胞群の示したチャンネル数(channel number)で腫瘍細胞の示したチャンネル数を除した値をDIとした。すなわち、

$$DI = \text{腫瘍の } G_0G_1 \text{ ピーク} / \text{正常二倍体細胞の } G_0G_1 \text{ ピーク}$$

と表現され、DNA ヒストグラムにてG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>ピークが単一の場合、つまり、腫瘍細胞と正常細胞の核 DNA 量

が相対的に等しい ( $DI=1.00$ ) と考えられた場合, これを DNA 二倍体腫瘍 (DNA diploid pattern, D 型) とした. 一方, DNA ヒストグラム上,  $G_0G_1$  ピークが複数存在する場合, DNA 異数倍体腫瘍 (DNA aneuploid pattern, A 型) とし, A 型の中で特に 3 つ以上の  $G_0G_1$  ピークが存在する場合は, 正常細胞群の他に少なくとも 2 つ以上の腫瘍細胞群が存在すると考えられ, DNA 複異数倍体腫瘍 (DNA multiploid pattern, M 型) とした. また, 正常細胞群の混入比率も考慮し, 4 倍体領域 ( $DI=2.00$ 前後) に全体の 12% 以上の細胞数を認める場合も DNA 異数倍体腫瘍のピークと判定, A 型とし, 12%未満の場合のみ  $G_2M$  期細胞を示しているものと判断した. なお, 測定精度の指標としての  $G_0G_1$  ピークの変動係数 (coefficient of variation, CV) が 10% 以上の症例は測定不能例と判断し評価対象外とした (図 1).

## 5. 統計学的検討

DI の平均値の検定, 背景因子 (年齢, 性別など) や臨床病理学的因子と DNA 倍体様式 (DNA ploidy pattern) との関連性の検定には  $\chi^2$  検定を用い, ノンパラメトリックな分布を示す DI の比較には Wilcoxon-Mann-Whitney 法または Kruskal-Wallis 法を用いた. また, 生存率の算出は Kaplan-Meier 法<sup>20)</sup>を用い, その有意差検定は一般化 Wilcoxon 法によった. いずれも, 危険率  $p<0.05$  をもって有意差ありと判定した. また, 多変量解析による予後因子の解析は, Cox の比例ハザードモデル<sup>21)</sup>を用い, 癌死の有無および生存期間を基準変数とし, 各背景因子, 臨床病理学的所見, および今回の核 DNA 量測定結果を説明変数として検討した. なお, 多変量解析では各変量間の相関関係に留意し, 強い相関を認める因子は同時に解析しなかった. また, 性別, 年齢は基礎的変量とし

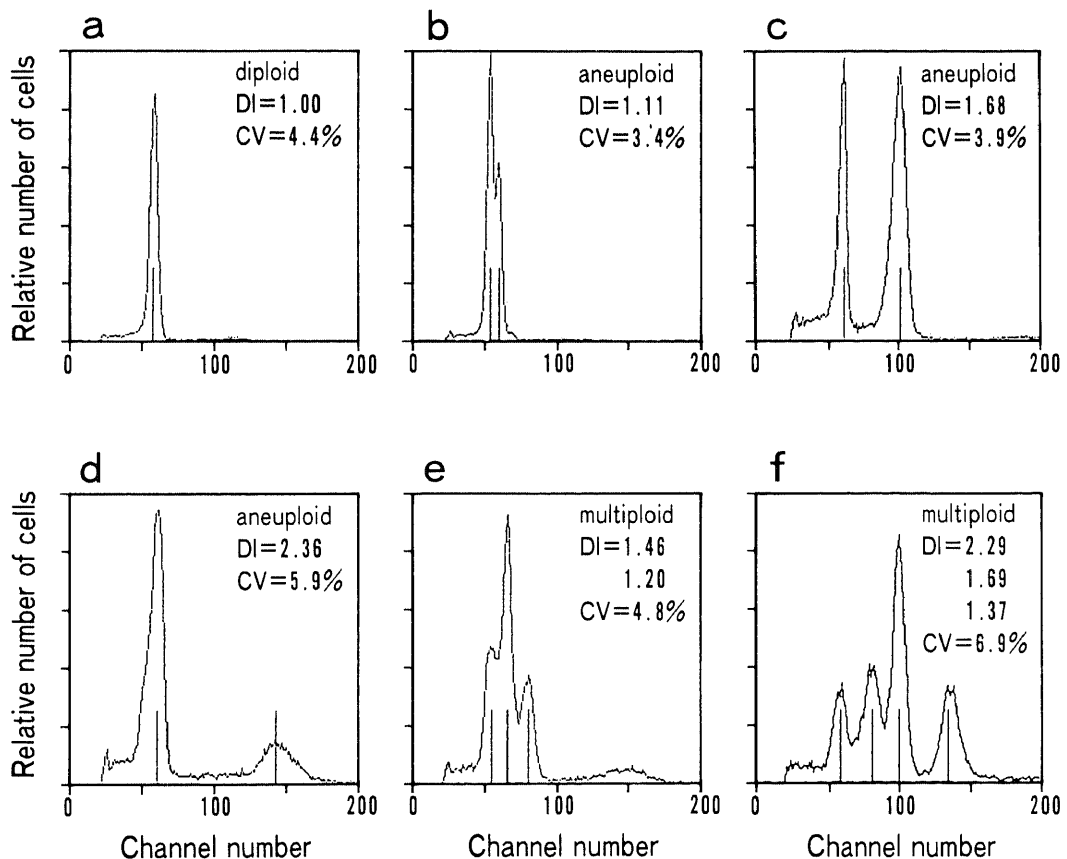


Fig. 1. Representative histograms of flow cytometrically determined DNA content distribution. (a) Tumor specimen exhibiting only diploid cell population. (b) (c) (d) Tumor specimen exhibiting one aneuploid cell population. (e) (f) Tumor specimen exhibiting more than one aneuploid stem line. The DNA index represents the ratio of relative DNA contents (in channel numbers) of tumor versus normal  $G_0G_1$  cells. DI, DNA index; CV, coefficient of variation.

て常に共変量とした。

## 成 績

### I. 正常細胞の核 DNA 量

コントロールとして使用した非癌正常部および転移陰性リンパ節各15例、計30例の核 DNA 量はいずれも二倍体を示し、DI は1.00であった。判定不能例は一例もなく、その平均変動係数 CV 値は $4.62 \pm 0.45\%$ であった。

### II. 原発巣腫瘍細胞の核 DNA 量

318例中313例 (98.4%) で原発巣の核 DNA 量の判

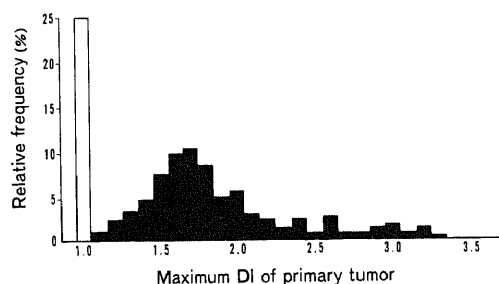


Fig. 2. Frequency histogram distribution of ploidy levels of primary lesion, expressed as maximum DNA index, for all patients. DNA index values spanned a wide range from a diploid value of 1.00 to a high hyperdiploid level of 3.39. Only 25% of all cases were truly diploid as indicated by the open bar. There were 64 cases with more than two tumor  $G_0G_1$  population; for simplicity reasons, only the highest DNA index value is charted. DI, DNA index; □, DNA diploid pattern; ■, DNA aneuploid pattern.

Table 1. Relationship between ploidy pattern of primary tumor and number of paraffin-embedded blocks used for each measurement

Number of paraffin-embedded blocks of primary tumor used	Number of tumors DNA ploidy pattern	
	D	A(M)
1 - 2	21	52( 9)
3 - 4	39	148(46)
5 - 7	18	35( 9)

$\chi^2$ -value=4.54, not significant.  
D, diploid; A, aneuploid; M, multiploid.

定が可能で、その平均変動係数 CV 値 $5.92 \pm 1.70\%$ であった。これらのうち腫瘍細胞と正常細胞の核 DNA 量が相対的に等しいと考えられたもの、すなわち、D型は78例 (24.9%) であった。一方、DNA ヒストグラム上、 $G_0G_1$ ピークが複数存在するA型は235例 (75.1%) で、さらに、その64例 (27.2%, 全体の20.4%) は3つ以上の  $G_0G_1$ ピークを認め、M型と判定された。DI (M型はその最大値) は1.00から3.39までで、全体平均は $1.68 \pm 0.57$ 、A型のみでは平均 $1.94 \pm 0.49$ であった (図2)。また、測定に用いた原発巣のパラフィン包埋ブロック数別にはA型およびM型の出現頻度に有意差を認めなかった (表1)。

### III. 原発巣核 DNA 量と臨床病理学的因子の関連

原発巣核 DNA 量測定結果によりD型とA型の2群に分け、臨床病理学的因子との関連について検討した (表2)。核 DNA 倍体様式別には腫瘍が末梢側発生であるものにA型が有意に多かったほかは、性別、年齢、術後病期、腫瘍最大径、術後 TNM 各因子<sup>6)</sup>、切除根治度、組織型 (腺癌と扁平上皮癌)、分化度のいずれにおいても有意差を認めなかった。DI の比較では女性が男性に比べ、有意に高く、腺癌が扁平上皮癌より、高分化癌が中低分化癌より、いずれも有意に高い値を示した。しかし、DNA 倍体様式別の比較において有意差を認めた腫瘍発生部位と DI には有意な関連性はみられなかった。また、年齢、術後病期、腫瘍最大径、術後 TNM 各因子、切除根治度の各因子においても有意差を認めなかった。

### IV. 原発巣核 DNA 量と生存率

原発巣核 DNA 量と術後生存率との関係を検討すると、D型78例の3年生存率 (3生率)、5年生存率 (5生率) が53.7%、48.0%であるのに対して、A型235例

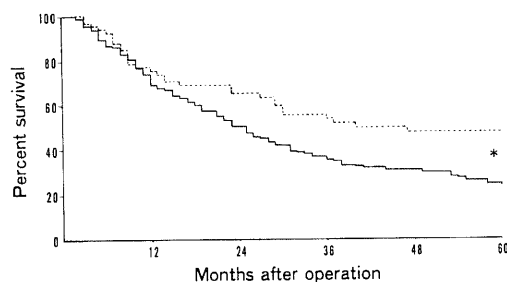


Fig. 3. Survival curves of all patients with non-small cell lung cancer subdivided according to DNA ploidy pattern of primary lesions. —, patients with aneuploid cell population in primary lesion; ·····, patients with only diploid cell population in primary lesion. \*,  $p < 0.05$ , by generalized Wilcoxon test.

ではそれぞれ35.5%, 23.8%と、有意にA型の予後が不良であった(図3)。術後病期別の検討では、I期92例中、D型20例の3生率、5生率がともに88.5%であるのに対して、A型72例ではそれぞれ59.7%, 43.6%と、A型が有意に予後不良であった(図4)。しかし、III期例では、D型35例の3生率、5生率はともに31.7%で、A型119例のそれぞれ17.7%, 9.8%に比べ予後良好傾向にあったが、術後2年以内の生存率に全く差を認めず、III期例全体としては統計学的有意差を認めなかった(図5)。さらにA型症例内でDI別に生存率を検討したが、生存率の差異は認められなかった。

#### V. 転移巣腫瘍細胞の核 DNA 量

術後 TNM 分類にて  $N_1$  以上または  $M_1$  とされたものの218例を対象に、手術時に原発巣とともに郭清ないし切除された転移巣について核 DNA 量を測定した。原発巣同時、リンパ節転移巣や肺内転移巣のパラフィン包埋ブロックを用い、核 DNA 量を測定し、それぞれの原発巣の核 DNA 量との異同につき検討した。218例中、213例(97.8%)で転移巣のうち少なくとも一腫瘍巣の核 DNA 量の判定が可能であった。原発巣がD型を示し、 $N_{13}$ であった症例48例中、22例(45.8%)でリンパ節転移巣にA型を示す腫瘍細胞の出現を認めた。同様に原発巣がD型を示した  $M_1$  症例6例中、2例(33.3%)で遠隔転移巣にA型腫瘍細胞の出現を認めた。また、原発巣とリンパ節転移巣ともにA型であっても、その DI が異なる症例があり(図6)、原発巣とリンパ節転移巣のそれぞれの最大 DI の相関について  $N_2$  症例125例で検討すると、相関係数  $r = 0.1057$  と相関を認めなかった(図7)。また、これらリンパ節

転移巣の最大 DI が原発巣の最大 DI の $\pm 10\%$ の範囲にあるものは125例中、41例(32.7%)であった。

#### VI. 全腫瘍巣核 DNA 量と臨床病理学的因子の関連

原発巣、転移巣のうち少なくともひとつがA型であったもの(total aneuploid pattern, T-A型)と、原発巣、転移巣のすべてがD型であったもの(total diploid pattern, T-D型)の2群に分け、臨床病理学的因子との関連について検討した(表3)。原発巣がD型の78例中、29例(37.2%)が転移巣の核 DNA 量測定にてD型以外の腫瘍細胞を含むことが明らかとなった。すなわち、最終的に原発巣・転移巣のすべてを対象とした全腫瘍巣核 DNA 量測定にて T-D 型と判定されたのは全310例中、49例(15.8%)で、病期の進行やN因子の増加によって T-D 型の有意な減少を認めた。また、腫瘍発生部位別の検討では末梢側発生の原発巣D型50例中、半数の25例が T-A 型であったのに対し、中枢側発生の原発巣D型28例中、24例(85.7%)が T-D 型と判定され、原発巣核 DNA 倍体様式別の検討よりもさらに強い有意差を認めた。その他、性別、年齢、腫瘍最大径、術後T因子、術後M因子、切除根治度、組織型(腺癌と扁平上皮癌)、分化度の各因子では有意な関連は認めなかった。DIの比較では DNA 倍体様式別の検討同様、術後病期の進行やN因子の増加により、DIは有意に高値を示した。また、女性が男性より、腺癌が扁平上皮癌より、高分化癌が中低分化癌より、それぞれ有意に高く、さらに腫瘍発生部位や切除根治度でも有意な関連を認めた。年齢、腫瘍最大径、術後T因子、術後M因子の各因子においては有意差を認めなかった。

#### VII. 全腫瘍巣核 DNA 量とリンパ節転移の関連

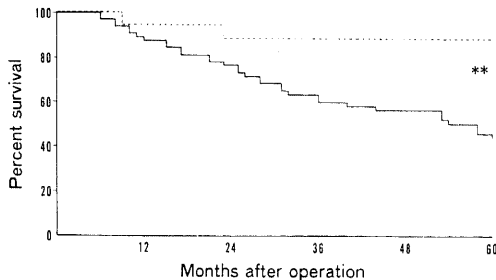


Fig. 4. Survival curves of patients with postoperative stage I non-small cell cancer subdivided according to DNA ploidy pattern of primary lesions. —, patients with aneuploid cell population in primary lesion; ·····, patients with only diploid cell population in primary lesion. \*\*,  $p < 0.01$ , by generalized Wilcoxon test.

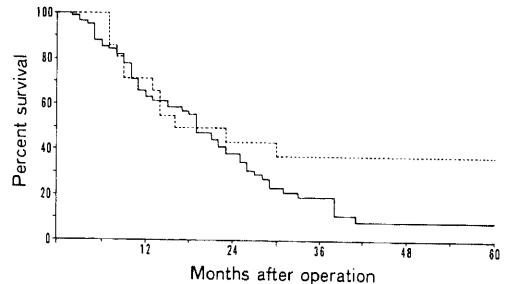


Fig. 5. Survival curves of patients with postoperative stage III non-small cell lung cancer subdivided according to DNA ploidy pattern of primary lesions. —, patients with aneuploid cell population in primary lesion; ·····, patients with only diploid cell population in primary lesion. Not significant, by generalized Wilcoxon test.

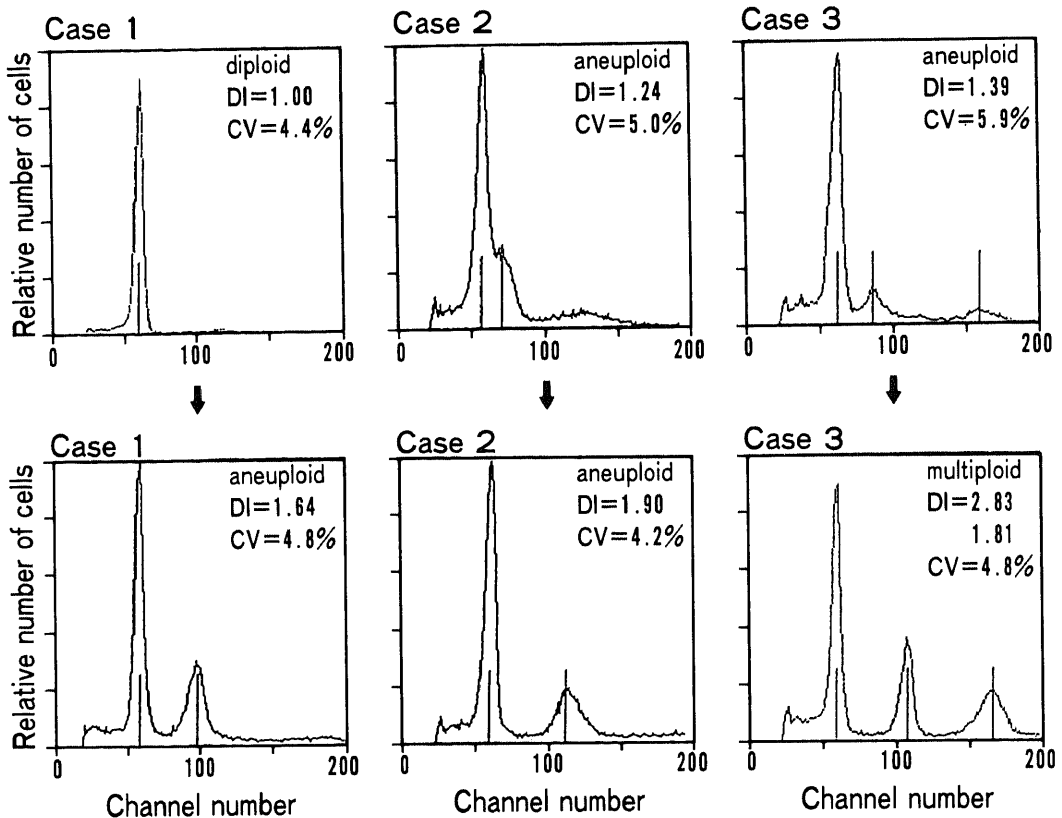


Fig. 6. Representative histograms of flow cytometrically determined heterogenous DNA content distribution between primary lesion (top) and lymph node metastasis (below). DNA stemlines are not identical between primary tumor and metastasis at all. In case 1, aneuploid stemline is detected only in metastasis. In case 2 and 3, aneuploid stemline different from ones in primary tumor are detected in metastasis. Multiploid pattern seen in case 3 is rarely detected in metastatic lesions. This heterogenous difference between primary tumor and metastasis suggests necessity of multiple site sampling to assess prognostic significance of cellular DNA content of lung cancer. DI, DNA index; CV, coefficient of variation.

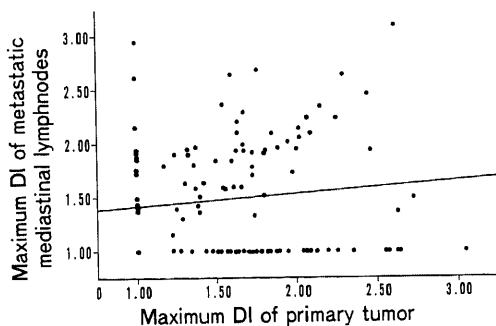


Fig. 7. Correlation of maximum DNA index between primary tumor and mediastinal lymph nodes metastasis.  $Y = 11.4X + 13.1$ ,  $r = 0.1057$ .

全腫瘍巢核 DNA の倍体様式 (total ploidy pattern) と転移陽性リンパ節数との関係を比較した。リンパ節の数はリンパ節部位毎に 1 レベルとした。T-D 型の 46 例中、23 例 (50.0%) にリンパ節転移が見られたが、5 レベル以上の転移を示したものはなく、T-A 型が有意に転移陽性リンパ節レベル数が多かった (表 4)。また、縦隔または  $N_3$  リンパ節転移陽性とされた 152 例では、T-D 型 11 例中、8 例 (72.7%) で肺内・肺門リンパ節転移を認めず、他の 3 例でも 1 レベルのみの肺内・肺門リンパ節転移であった。これに対し、T-A 型 141 例中、39 例 (27.7%) 2 レベル以上の肺内・肺門リンパ節転移を認め、有意に多かった (表 5)。縦隔または  $N_3$  リンパ節転移陽性レベル数でも同様の傾向を認めた。

Table 2. Relationship between clinicopathological factors and DNA ploidy pattern or DNA index of primary tumor in 313 patients with non-small cell lung cancer

Clinicopathological factors		Number of cases DNA ploidy pattern			DNA index (mean±SD)	
		Diploid	Aneuploid			
Total		78	235		1.68±0.57	
Sex	male	61	169	NS*)	1.64±0.55	p<0.05**)
	female	17	66		1.79±0.61	
Age	~65	44	123	NS*)	1.67±0.56	NS**)
	66~	34	112		1.70±0.58	
Stage <sup>a)</sup>	I	20	72	NS*)	1.75±0.59	NS***)
	II	14	28		1.69±0.65	
	III A	25	94		1.67±0.52	
	III B	10	25		1.62±0.57	
	IV	9	16		1.57±0.57	
Tumor size <sup>b)</sup>	~30	21	51	NS*)	1.66±0.57	NS***)
	31~60	43	127		1.70±0.60	
	61~90	9	47		1.66±0.43	
	91~	5	10		1.70±0.66	
T <sup>c)</sup>	1	15	50	NS*)	1.69±0.53	NS***)
	2	40	120		1.72±0.60	
	3	16	44		1.59±0.52	
	4	7	21		1.65±0.57	
N <sup>c)</sup>	0	24	77	NS*)	1.71±0.58	NS***)
	1	19	36		1.67±0.64	
	2	28	109		1.69±0.54	
	3	7	13		1.51±0.47	
M <sup>c)</sup>	0	69	219	NS*)	1.69±0.57	NS**)
	1	9	16		1.57±0.57	
Tumor site	periphery	50	180	p<0.05*)	1.71±0.57	NS**)
	central	28	55		1.64±0.58	
Curability <sup>d)</sup>	AC	31	94	NS*)	1.75±0.61	NS***)
	RC	23	76		1.68±0.54	
	RN	7	26		1.62±0.51	
	AN	17	39		1.60±0.55	
Histology <sup>d)</sup>	adeno	28	111	NS*)	1.78±0.60	p<0.05**)
	epidermoid	33	107		1.66±0.53	
	large	4	5		1.41±0.52	
	adenosq	4	6		1.59±0.63	
	double	4	5		1.23±0.28	
	others	5	1		1.12±0.26	
Different. <sup>e)</sup>	well	17	87	NS*)	1.80±0.56	p<0.01***)
	moderate	26	78		1.64±0.53	
	poor	20	44		1.54±0.52	

a) Stage, T, N, M; postoperative staging and TNM classification according to general rule for clinical and pathological record of lung cancer (the Japan Lung Cancer Society)

b) Maximum size in diameter (mm).

c) Operative curability: AC, absolute curative; RC, relative curative; RN, relative noncurative; AN, absolute noncurative.

d) Histological type: adeno, adenocarcinoma; epidermoid, epidermoid carcinoma; large, large cell carcinoma; adenosq, combined epidermoid and adenocarcinoma; double, cases who has more than two primary lesions of carcinoma; others, one adenoid cystic carcinoma, two carcinoids, two mucoepidermoid carcinomas, and one carcinosarcoma.

e) Different, tumor cell differentiation

\*) By chi-square test or Fisher's exact probability test.

\*\*) By Wilcoxon-Mann-Whitney test.

\*\*\*) By Kruskal-Wallis test.

NS, not significant.

Table 3. Relationship between clinicopathological factors and total DNA ploidy pattern<sup>1)</sup> or maximum DNA index of tumor, which includes both primary and metastatic lesions, in 310 patients with non-small cell lung cancer

Clinicopathological factors		Number of cases Total ploidy pattern <sup>1)</sup>			DNA index (mean±SD)	
		Diploid	Aneuploid			
Total		49	261		1.84±0.59	
Sex	male	38	189	NS*)	1.81±0.60	p<0.05***)
	female	11	72		1.93±0.57	
Age	~65	28	140	NS*)	1.83±0.59	NS**)
	66~	21	121		1.85±0.59	
Stage <sup>d)</sup>	I	20	72	p<0.05*)	1.75±0.59	p<0.05***)
	II	11	30		1.79±0.70	
	III A	12	103		1.85±0.52	
	III B	2	34		2.04±0.55	
	IV	4	22		1.98±0.66	
Tumor size <sup>b)</sup>	~30	14	59	NS*)	1.78±0.57	NS***)
	31~60	28	139		1.88±0.62	
	61~90	5	50		1.75±0.42	
	91~	2	13		2.18±0.69	
T <sup>a)</sup>	1	11	54	NS*)	1.80±0.55	NS***)
	2	28	130		1.85±0.63	
	3	8	51		1.77±0.52	
	4	2	26		2.07±0.57	
N <sup>a)</sup>	0	23	77	p<0.001*)	1.72±0.58	p<0.01***)
	1	15	40		1.77±0.67	
	2	10	125		1.93±0.53	
	3	1	19		2.11±0.61	
M <sup>a)</sup>	0	45	239	NS*)	1.83±0.58	NS**)
	1	4	22		1.98±0.66	
Tumor site	periphery	25	202	p<0.001*)	1.89±0.56	p<0.05**)
	central	24	59		1.75±0.66	
Curability <sup>d)</sup>	AC	28	97	NS*)	1.78±0.63	p<0.05***)
	RC	11	85		1.84±0.52	
	RN	4	28		1.78±0.57	
	AN	6	51		2.03±0.60	
Histology <sup>d)</sup>	adeno	14	126	NS*)	1.98±0.58	P<0.001**)
	epidermoid	26	112		1.78±0.58	
	large	0	8		1.70±0.45	
	adenosq.	3	6		1.66±0.63	
	double	3	6		1.39±0.37	
	others	3	3		1.29±0.38	
Different. <sup>a)</sup>	well	7	97	NS*)	2.00±0.55	p<0.001***)
	moderate	22	79		1.75±0.56	
	poor	9	55		1.76±0.53	

1) Total DNA ploidy pattern, diploid, tumors without any aneuploid cell population in primary and metastatic sites; aneuploid, tumors with at least one aneuploid cell population in primary or metastatic sites

a), b), c), d), e) Refer to the footnotes of Table 2. table.

\*) By chi-square test or Fisher's exact probability test.

\*\*) By Wilcoxon-Mann-Whitney test.

\*\*\*) By Kruskal-Wallis test.

NS, not significant.



## VIII. 全腫瘍巣核 DNA 量と生存率

全腫瘍巣核 DNA 量と術後生存率との関係を検討した。T-D 型全49例の3生率, 5生率, 70.7%, 65.2%に対し, T-A 型全261例ではそれぞれ34.1%, 22.6%と, 有意にT-A 型の予後が不良であった(図8)。さらに臨床病理学的な背景因子毎に細分類し, 全腫瘍巣核 DNA 量と生存率の関連について検討した。原発巣の核 DNA 量別の生存率比較では有意差を認めなかったIII期例でも, T-D 型全14例の3生率, 5生率とも58.9%, T-A 型全137例のそれぞれ17.4%, 10.5%に比べ有意に予後良好であり(図9), 術後病期IIIA期に限定しても同様な結果であった。その他の背景因子では, 腫瘍最大径 60mm 以下, 術後 T<sub>1-2</sub>, 同 N<sub>0</sub>, 同 M<sub>0</sub>, 中枢側発生腫瘍, 治癒切除群, 腺癌, 扁平上皮癌, 高分化群, 中分化群の各群において T-D 型は T-A 型より有意に予後良好であった。また, 症例数が少ないため有意差はなかったが, II 期, 腫瘍最大径 61mm 以上, 術後 T<sub>3</sub>, 同 N<sub>1-2</sub>, 末梢側発生腫瘍, 相対

的非治癒切除群, 低分化群, の各群において T-D 型は T-A 型より予後良好傾向にあった(表6)。

## IX. 核 DNA 量の予後因子としての独立性の検討

核 DNA 量の予後因子としての独立性を Cox 比例ハザードモデル<sup>21)</sup>を用いて検討した。単変量解析では今回の検討対象因子のうち, 術後病期, 腫瘍最大径, 術後 TNM 因子, 腫瘍発生部位, 切除根治度, および核 DNA 量が予後に有意に影響していると考えられた(表7)。これらのうち, 術後 TNM の各因子とそれによって定義される術後病期には強い相関があり, また, 切除根治度も術後病期やN因子と強い相関を認めたため(表8), これらは共変量として同時には解析しなかった。最終的に術後 TNM の各因子, 性別, 年

Table 4. Number of metastatic lymph nodes related to total ploidy pattern<sup>1)</sup> in 298 non-small cell lung cancers.

Number of metastatic lymph nodes	Number of cases Total ploidy pattern <sup>1)</sup>	
	Diploid	Aneuploid
0	23	77
1-2	20	89
3-4	3	46
5-6	0	27
7-8	0	9
9-10	0	4

$\chi^2$ -value=15.65,  $p<0.01$ .

1) Refer to the footnotes of Table 3.

Table 5. Number of metastatic hilar or intrapulmonary lymph nodes related to total ploidy pattern<sup>1)</sup> in 152 pN2-3 non-small cell lung cancers.

Number of metastatic hilar or intrapulmonary lymph nodes	Number of cases Total ploidy pattern <sup>1)</sup>	
	Diploid	Aneuploid
0	8	40
1	3	62
2	0	35
3	0	4

$\chi^2$ -value=10.07,  $p<0.05$ .

1) Refer to the footnotes of Tables 3.

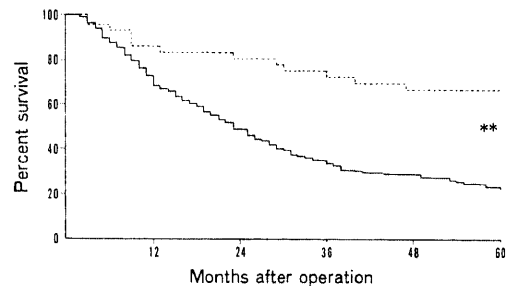


Fig. 8. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer subdivided according to total DNA ploidy pattern. —, patients with aneuploid cell population in primary lesion and/or metastasis; ·····, patients with only diploid cell population both in primary lesion and in metastasis. \*\*,  $p<0.01$ , by generalized Wilcoxon test.

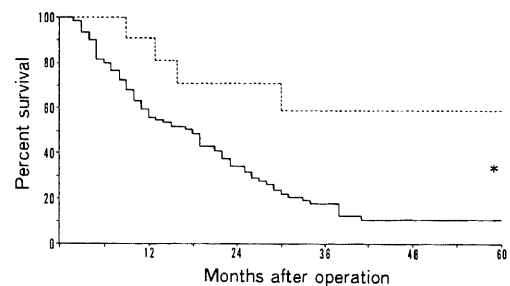


Fig. 9. Survival curves of patients with postoperative stage III non-small cell lung cancer subdivided according to total DNA ploidy pattern. —, patients with aneuploid cell population in primary lesion and/or metastasis; ·····, patients with only diploid cell population both in primary lesion and in metastasis. \*,  $p<0.05$ , by generalized Wilcoxon test.

Table 6. Comparison of survival rate based on difference of total ploidy pattern<sup>1)</sup>

Clinicopathological factors		% Survival <sup>*)</sup>				p-value <sup>**)</sup>
		Total ploidy pattern <sup>1)</sup>				
		Diploid	Aneuploid			
		3yrs.	5yrs.	3yrs.	5yrs.	
Total		70.7	65.2	34.1	22.6	<0.001
Sex	male	60.7	53.1	31.1	20.6	<0.01
	female	100.0	100.0	40.6	27.1	<0.001
Age	~65	77.4	69.7	34.9	23.9	<0.001
	66~	55.9	55.9	33.1	21.2	NS
Stage <sup>d)</sup>	I	88.5	88.5	60.7	44.3	<0.05
	II	68.2	56.8	40.8	29.1	NS
	III A	67.5	67.5	18.3	9.2	<0.05
	III B	0.0	0.0	16.2	16.2	NS
	IV	25.0	0.0	22.3	0.0	NS
Tumor size <sup>b)</sup>	~30	90.9	81.8	45.1	37.9	<0.005
	31~60	57.8	52.5	34.6	20.5	<0.05
	61~90	50.0	50.0	23.6	17.7	NS
	91~	100.0	100.0	18.6	0.0	NS
T <sup>a)</sup>	1	100.0	88.9	51.6	38.3	<0.01
	2	68.7	63.8	35.2	23.6	<0.01
	3	42.9	42.9	18.3	4.6	NS
	4	0.0	0.0	19.0	12.7	NS
N <sup>a)</sup>	0	84.7	84.7	60.5	43.1	<0.05
	1	62.7	54.8	41.8	25.1	NS
	2	61.0	40.5	15.0	7.5	NS
	3	0.0	0.0	—	—	NS
M <sup>a)</sup>	0	75.2	72.2	35.5	25.0	<0.001
	1	25.0	0.0	22.2	0.0	NS
Tumor site	periphery	67.4	61.8	33.9	21.8	NS
	central	73.1	67.5	33.9	25.4	<0.005
Curability <sup>d)</sup>	AC	83.4	79.0	55.7	39.8	<0.01
	RC	65.6	65.6	20.1	15.1	<0.05
	RN	50.0	50.0	19.8	6.6	NS
	AN	20.0	0.0	19.9	5.0	NS
Histology <sup>d)</sup>	adeno	81.5	81.5	37.6	23.6	<0.01
	epidermoid	62.6	57.4	32.4	23.3	<0.05
	others	75.0	62.5	22.2	16.7	NS
Different. <sup>d)</sup>	well	71.4	71.4	35.0	25.5	<0.05
	moderate	76.2	60.9	33.0	29.7	<0.05
	poor	62.5	62.5	28.3	17.7	NS

1), a), b), c), e) Refer to the footnotes of Table 3.

d) Histological type: adeno, adenocarcinoma; epidermoid, epidermoid carcinoma; others, nine large cell carcinomas, 10 combined epidermoid and adenocarcinomas, one adenoid cystic carcinoma, two carcinoids, two mucoepidermoid carcinomas, one carcinosarcoma, and nine cases who have more than two primary lesions of carcinoma

\*) By Kaplan-Meier method.

\*\*) By generalized Wilcoxon test

NS, not significant.

Table 7. Comparison of survival rate based on difference of cellular DNA content and clinicopathological factors (univariate analysis)

Clinicopathological factors		%Survival		p-value <sup>*)</sup>
		3yrs	5yrs	
Total		40.2	30.2	
Total ploidy <sup>b)</sup>	diploid	70.7	65.2	] <0.0001
	aneuploid	34.1	22.6	
Total max DI <sup>b)</sup>	—1.00	70.7	65.2	] <0.05 NS NS
	1.01—1.50	39.8	33.2	
	1.51—2.00	31.8	21.6	
	2.01—	33.6	18.1	
Primary ploidy <sup>b)</sup>	diploid	53.7	48.0	] <0.05
	aneuploid	35.5	23.8	
Primary DI <sup>b)</sup>	—1.00	53.7	48.0	] NS NS NS
	1.01—1.50	38.4	24.7	
	1.51—2.00	31.6	21.4	
	2.01—	38.4	24.4	
Sex	male	36.3	26.8	] NS
	female	49.0	37.7	
Age	~65	43.5	33.5	] NS
	66~	35.9	25.8	
Stage <sup>a)</sup>	I	66.7	54.1	] NS <0.005 <0.005 NS
	II	48.8	37.5	
	III A	23.7	16.4	
	III B	13.6	13.6	
	IV	22.8	0.0	
Tumor size <sup>b)</sup> (mm)	~30	55.2	47.8	] <0.005 NS NS
	31~60	38.4	26.0	
	61~90	26.7	21.4	
	91~	30.0	14.8	
T <sup>a)</sup>	1	60.7	48.2	] <0.005 <0.005 <0.05
	2	41.4	31.2	
	3	23.1	13.2	
	4	17.4	11.6	
N <sup>a)</sup>	0	64.8	52.7	] <0.05 <0.001 <0.05
	1	48.0	34.7	
	2	17.9	9.8	
	3	—	—	
M <sup>a)</sup>	0	42.1	33.3	] <0.005
	1	22.8	0.0	
Tumor site	periphery	37.6	26.5	] <0.05
	central	46.2	39.4	
Curability <sup>a)</sup>	AC	52.1	49.4	] <0.001 NS <0.05
	RC	25.9	21.9	
	RN	23.0	11.5	
	AN	20.1	4.0	
Histology <sup>a)</sup>	adeno	41.9	29.6	] NS
	epidermoid	38.7	30.9	
	others	37.6	29.6	
Different. <sup>a)</sup>	well	38.4	30.2	] NS NS
	moderate	42.3	36.4	
	poor	32.7	23.9	

1) Refer to the footnotes of Table 3.

2) Maximum DNA index of primary and metastatic tumors.

3) DNA ploidy pattern of the primary tumor.

4) Maximum DNA index of the primary tumor.

a), b), c), e) Refer to the footnotes of Table 1.

d) Refer to the footnotes of Table 6.

\*) By Kaplan-Meier method.

\*\*) By generalized Wilcoxon test.

NS, not significant.

齢の5変量が選択され、これに核DNA量に関する因子、すなわち、原発巣核DNA倍体様式、原発巣最大DI、全腫瘍巣核DNA倍体様式、全腫瘍巣最大DIのひとつをそれぞれ加えて、予後因子としての独立性を

評価した(表9)。その結果、核DNA量に関する因子のうち、全腫瘍巣核DNA倍体様式、原発巣核DNA倍体様式、全腫瘍巣最大DIは術後TNM因子、性別、年齢を考慮しても独立した予後因子である

Table 8. Simple correlation coefficient between prognostic factors

Prognostic factors	Correlation coefficient between each prognostic factor and						
	T	N	M	Stage	Curability	Sex	Age
Total ploidy <sup>1)</sup>	0.071	0.206	0.004	0.137	0.122	0.042	0.026
T <sup>a)</sup>		0.337	0.206	0.554	0.489	-0.101	-0.034
N <sup>a)</sup>			0.219	0.802	0.651	0.053	-0.042
M <sup>a)</sup>				0.606	0.540	0.055	-0.141
Stage <sup>a)</sup>					0.825	0.044	-0.109
Curability						0.044	-0.034
Sex							-0.093

1), a) Refer to the footnotes of Table 7.

Table 9. Multivariate analysis as prognostic parameters based on 309 cases with non-small cell lung cancer by Cox proportional hazards model

Parameter <sup>a)</sup>	Hazard ratio(95% CI <sup>**</sup> )	F-value	p-value
Total ploidy <sup>1)</sup>	2.61(1.49~4.57) <sup>b)</sup>	11.31	<0.001
Total DI(1.00=1) <sup>2)</sup>	1.33(1.03~1.71)	4.84	<0.05
primary ploidy <sup>3)</sup>	1.78(1.20~2.64) <sup>b)</sup>	8.09	<0.005
Primary DI(1.00=1) <sup>4)</sup>	1.28(0.99~1.66)	3.51	NS
T (1,2,3,4) <sup>a)</sup>	1.29(1.06~1.56)	6.72	<0.01
N (0,1,2,3) <sup>a)</sup>	1.90(1.58~2.28)	46.04	<0.001
M (0,1) <sup>a)</sup>	1.75(1.07~2.88)	4.91	<0.05
Sex(male=1)	0.63(0.44~0.91)	6.21	<0.05
Age(~65=1)	1.20(0.88~1.66)	1.30	NS

\*)One of upper four parameters which are related to DNA content is multivariately analyzed with lower five ones, respectively.

\*\*)CI, confidence interval.

1), 2), 3), 4), a) Refer to the footnotes of Table 7.

b) Relative risk of DNA aneuploid to DNA diploid.

Table 10. Significance of ploidy pattern of primary tumor as prognostic factor in limited groups by multivariate analysis (Cox proportional hazards model) based on non-small cell lung cancer

Hazard ratio <sup>*</sup> (95% CI <sup>**</sup> )	F-value	p-value	in limited group below
2.38(1.38~4.05)	9.90	<0.01	Curative resection(n=221)
6.00(1.38~26.22)	5.68	<0.05	Stage I(n=91)
2.68(1.18~6.09)	5.50	<0.05	tumor site; central(n=81)
1.58(1.03~2.43)	4.33	<0.05	Male(n=226)
1.55(1.00~2.39)	3.90	<0.05	N 1-3(n=211)
—————	3.78	NS	Epidermoid carcinoma(n=139)
—————	0.72	NS	Adenocarcinoma(n=140)

\*)Relative risk of DNA aneuploid to DNA diploid.

\*\*)CI, confidence interval.

可能性が示された。また、このうち、全腫瘍巣核 DNA 倍体様式が最も F 値が大きく、相対危険度を示すハザード比も T-D 型 = 1 に対して、T-A 型 = 2.61 と最も高かった。さらに、その相関の強さのため共変量として解析しなかった各背景因子についてそれぞれを特定の制限因子とし、その中での原発巣および全腫瘍巣核 DNA 倍体様式の予後因子としての独立性について検討した。原発巣核 DNA 倍体様式は治癒切除例 (n=224)、術後病期 I 期例 (n=91)、中枢側発生例 (n=82) の各群で、F 値 > 5.00 と有意な独立予後因子であったが、非治癒切除例や転移巣が存在する症例を多く含む群、すなわち男性 (n=229)、リンパ節転移陽性例 (n=211) では F 値が低く、ハザード比、信頼区間ともかなり低い値を示した。さらに扁平上皮癌 (n=139) や腺癌 (n=140) のみの検討では独立性は認められなかった (表10)。一方、全腫瘍巣核 DNA 倍体様式は制限因子のため対象症例数が限られるにも関わらず、治癒切除例 (n=221)、リンパ節転移陽性例 (n=209)、病期 I 期 (n=91)、男性 (n=226)、扁平上皮

癌症例 (n=137)、中枢側発生例 (n=81)、腺癌症例 (n=140) の各群で、予後因子としての独立性が示された (表11)。特に絶対的および相対的治癒切除例を対象とした多変量解析で T 因子が全く予後と無関係であったのに対し、全腫瘍巣核 DNA 倍体様式は、F 値 = 12.46,  $p=0.00051$  と優れた予後因子であった。

#### X. 核 DNA 量と再発部位

予後因子として以外の核 DNA 量測定の意義を検討する目的で、術後再発部位と原発巣および全腫瘍巣の DNA 倍体様式との関係につき評価した。治癒切除術がなされ、かつ術後の経過観察にて最初に確認された再発部位が明確な111例を対象とした。原発巣が D 型の24例中、17例 (70.8%) が N<sub>2</sub>リンパ節、血行性肺転移を含む胸郭内に最初の再発を認めた。これに対し、原発巣が A 型の87例中、54例 (62.1%) は脳、骨、肝などの遠隔臓器に最初の再発が確認され、再発部位と核 DNA 量の間に有意な関連を認めた (表12)。さらに全腫瘍巣核 DNA 倍体様式別の検討では、T-D 型の11例中、10例 (90.9%) が胸郭内に最初の再発巣を認

Table 11. Significance of total ploidy pattern<sup>1)</sup> as prognostic parameter in limited groups by multivariate analysis (Cox proportional hazards model) based on cases of non-small cell lung cancer

Hazard ratio*(95% CI**)	F-value	p-value	in limited group below
3.73(1.80~ 7.74)	12.46	<0.001	Curative resection(n=221)
2.28(1.18~ 4.42)	6.22	<0.05	N 1-3(n=209)
6.00(1.38~26.22)	5.68	<0.05	Stage I(n=91)
2.00(1.13~ 3.55)	5.64	<0.05	Male(n=226)
2.22(1.08~ 4.56)	4.75	<0.05	Epidermoid carcinoma(n=137)
2.83(1.11~ 7.23)	4.74	<0.05	tumor site; central(n=81)
4.11(1.00~17.01)	3.81	<0.05	Adenocarcinoma(n=140)

\*)Relative risk of DNA aneuploid to DNA diploid

\*\*)CI, confidence interval.

1)Refer to the footnotes of Table 3.

Table 12. Site of initial recurrence related to DNA ploidy pattern of primary tumor

DNA ploidy pattern	Number of cases tested	Number(%) of cases with initial recurrence	
		Local*)	Distant**)
Aneuploidy	87	33(38%)	54(62%)
Diploidy	24	17(71%)	7(29%)

$\chi^2$  value=8.23,  $p<0.01$

\*)Local; cases which initial recurrence occurred within the thoracic cavity, i.e. local nodes, lungs, or bronchus.

\*\*)Distant; cases which initial recurrence occurred in the distant organs, i.e. brain, bone, liver, or other distant organs.

Table 13. Site of initial recurrence related to total DNA ploidy pattern<sup>1)</sup>

Total ploidy pattern <sup>1)</sup>	Number of cases tested	Number(%) of cases with initial recurrence	
		Local*)	Distant**)
Aneuploidy	93	40(43%)	53(57%)
Diploidy	11	10(91%)	1(9%)

$\chi^2$  value=9.04,  $p<0.01$

\*), \*\*)Refer to the footnotes of Table 12.

1) Refer to the footnotes of Table.3

め、T-A 型と比べ、有意に胸郭内再発率が高かった(表13)。

## 考 察

肺癌は各種臓器癌の中でもっとも多様性、多面性の高い癌腫のひとつと考えられ、その発生母地や組織型、分化度により様々な形態を示すことが指摘されている<sup>24)25)</sup>。近年、TNM 分類などの腫瘍全体の悪性度指標とは別に腫瘍細胞個々の増殖能や転移能が注目されるようになり、小型肺腺癌でも核異型度が予後と関連することが示された<sup>26)</sup>。さらに近年のフローサイトメトリ法の普及発展にともない、癌細胞核 DNA の計量的解析や細胞動態解析が簡便となり、各種固形癌でその有用性が報告されるようになった<sup>7-13)27)</sup>。

今回、著者は肺癌腫瘍細胞の核 DNA 量を測定し、その臨床的意義について検討した。核 DNA 量は癌細胞特性の計量的解析の中でもっとも広く臨床的に検討されているもので、無制限に増殖する癌細胞内ではその量的異常が高率に認められ、染色体レベルの変化と関連していることが指摘されている<sup>28)</sup>。従来、顕微蛍光測光法を用いて検討されていたが、フローサイトメトリ法の進歩に伴い、比較的簡便に、かつ、客観的に多数の細胞の核 DNA 量測定が可能となった。また、Hedley ら<sup>29)</sup>がパラフィン包埋組織を用いた測定が可能であることを示して以来、過去の切除例を対象とした臨床的検討もなされ、胃癌<sup>30)35)</sup>、大腸癌<sup>31)32)</sup>、胆嚢癌<sup>33)</sup>、乳癌<sup>13)</sup>、子宮癌<sup>12)</sup>、卵巣癌<sup>10)34)</sup>、頭頸部癌<sup>35)</sup>、喉頭癌<sup>11)</sup>など様々な固形腫瘍で、診断や予後推定など悪性度の指標としての有用性が報告されている。肺癌を対象に核 DNA 量を測定し、その意義について臨床的に検討した報告は多数みられるが<sup>8)7-9)17)37-40)</sup>、肺癌全体について総合的に評価したものはいまだ少なく<sup>8)41)42)</sup>、また、その報告内容も一定していない。I 期症例や治療切除例に限った検討では腫瘍細胞核 DNA 量の倍体様

式が、D型を示す群がA型を示す群に比べ有意に予後良好とするものがほとんどであるが、III期以上の進行例や組織型別の検討では見解の一致を見ていない。これは測定法や測定結果解析法および検討症例数などにさまざまな相違が見られるためと思われる。Carey ら<sup>14)</sup>は20例の肺癌切除例を対象にその原発巣から延べ208個の組織を採取し、それぞれの核 DNA 量を測定した結果、一様にD型であったのは一例のみで、20例中19例95%では少なくともひとつのA型細胞群の出現を認めたと報告している。肺癌は同一腫瘍内でも組織学的に多様性が高い特徴があり、これが核 DNA 量における腫瘍内多様性と関連しているようで興味深い。他臓器癌でも同様の検討がなされているが、肺癌の腫瘍内多様性は腎細胞癌44%<sup>44)</sup>、乳癌24%<sup>45)</sup>、卵巣癌21%<sup>46)</sup>、胃癌40%<sup>30)</sup>、結腸癌7%<sup>30)</sup>に比べ、はるかに高いと言える。また、Tirindelli-Danesi ら<sup>17)</sup>は肺癌77例の切除腫瘍と24例の非切除例生検組織の核 DNA 量を測定比較し、原発巣およびリンパ節転移巣から複数のサンプリングが可能であった切除例の方が有意に多くの腫瘍細胞群を同定できたと述べている。さらに、彼らは予後因子としての意義を検討するには、各例につき可及的に多くのサンプリングが必要であると結論している。核 DNA 量の測定は米粒大の新鮮組織があれば可能であるが腫瘍全体を反映させることはできない。今回の検討では今後の肺癌核 DNA 量測定の標準となりうるように配慮したサンプリングを行った。すなわち、適当な一部分のみを測定に用いるのではなく、腫瘍最大断面全面から腫瘍細胞が得られるよう配慮し、かつ、転移陽性のものではその転移巣についても核 DNA 量の測定を行った。広範囲から十分な新鮮標本が採取できればパラフィン包埋組織を利用せずすむが、切除標本に対する通常の病理学的検索をする上で問題が残る実際のではない。肺癌のように腫瘍内多様性が高いと考えられる腫瘍を臨床材料として研究

を行う際は、常にこの点に留意すべきと思われる。原発巣については個々のパラフィン包埋ブロック毎に核 DNA 量を測定するのではなく、腫瘍最大断面を構成するパラフィン包埋ブロック個々から得られた切片を一括して測定することで全体の量的意義についても検討しえた。このように一貫した方法でサンプリングを行い、予後因子としての意義について検討した報告は本研究が最初である。

まず原発巣のみの測定では313例中、235例(75.1%)がA型と判定された。フローサイトメトリーを用いたこれまでの報告では肺癌の異数倍体腫瘍出現率は45%~86%とかなりバラツキが多く<sup>7)~9)15)~17)73)84)40)~42)45)~47)</sup>、サンプリング法にその一因があるものと思われる。山岡ら<sup>48)</sup>は非小細胞肺癌210例の検討でA型の出現頻度は77.2%で、さらに複数の異数倍体の出現を認めるM型例は全体の8.6%であったと報告している。今回の検討ではA型の出現頻度に差を認めないが、M型例は原発巣のみの検討でも64例、20.4%と高頻度であった。これは原発巣について十分広範囲なサンプリングを行い得たことによるものと思われる。また、測定に用いた原発巣のパラフィン包埋ブロック数別にはA型の出現頻度に有意差はなく、A型の出現が腫瘍径とは無関係である可能性および今回のサンプリング法の妥当性が示された。

さらに転移陽性例218例を対象に転移巣核 DNA 量を測定した。原発巣がD型で、そのリンパ節転移巣についても測定しえた48例中、22例(45.8%)でA型腫瘍細胞の出現を認め、また、原発巣・転移巣ともにA型であってもそのDIが異なる例が多数認められた。原発巣内同様、原発巣・転移巣間の多様性の存在はよく知られており、臨床的にも原発巣・転移巣間の組織像の相違や、抗癌剤に対する反応の違いを認める症例も多い。原発巣・転移巣間にさまざまな相違が存在する原因として山岡ら<sup>48)</sup>は肺癌12例を対象として、原発巣と転移巣の細胞内DNA量・RNA量を測定し、原発巣腫瘍の中でより転移しやすい癌細胞のみが選択され転移する可能性が高いためと推定している。一方、力武<sup>49)</sup>はリンパ節転移陽性の食道癌61例の検討より、正常体細胞と類似の核DNA量を持つD型細胞がリンパ節に転移し、転移成立後、リンパ節内でその環境に応じ個々の癌細胞の核DNA量が変動し、結果として多様性が生じるものと推定している。今回の検討では原発巣・転移巣ともにA型である場合、転移巣の方がより高いDIとなる傾向を認めたが、一方、原発巣がA型であっても転移巣にはD型の癌細胞しか認めないものもあり、リンパ節転移成立機序における細胞選択過

程の関与についてはさらに詳細な検討が必要と考えられる。Volmら<sup>19)</sup>は18例の原発性肺癌で原発巣と転移巣の核DNA量を比較した結果、10例で一致し、リンパ節転移巣の核DNA量を測定する意義は少ないとしている。本研究でも、リンパ節の大部分が腫瘍組織に占拠されている症例で、かつ原発巣がA型である場合に限れば同様の傾向が得られている。しかし、微小転移巣であってもA型細胞を明確にとらえることができ、かつ、その癌細胞と同じDIを原発巣の中に見いだせない例も多数存在した。

フローサイトメトリーは多数の細胞を客観的にかつ迅速に測定しうる反面、相対的に数が少ない微小細胞群を選択的に検出することは困難な場合が多く、原発巣の検索では捉えられなかった転移能の高い微小細胞群がリンパ節に転移する可能性がある一方、原発巣に広く存在する腫瘍細胞群が、D型かA型かあるいは転移能が高いか低いかによらず、リンパ節に転移し、その環境に応じ個々の癌細胞の核DNA量が変動し、結果として原発巣転移巣間の多様性が生じる可能性もある。遠隔転移巣についても同様であり、この問題についてフローサイトメトリーによる測定結果からのみ判断することは困難であろう。むしろ、常にその問題点を念頭に入れて測定結果を利用すべきである。原発巣・転移巣のすべてがD型と判定されても、A型細胞群が潜在している可能性もあり、フローサイトメトリー本来の量的表現を質的カテゴリーに分類するに際し、常に注意が必要である。今回は原発巣・転移巣いずれかで明かなA型細胞群を認めた場合、全腫瘍巣核DNA量がA型であると判定し、T-A型と表現した。これに対し、原発巣・転移巣のすべてがD型であると判定されたものをT-D型とし、両群間の臨床病理学的因子や予後の相違について検討した。

臨床病理学的因子としてTNM分類、術後病期、切除根治度、組織型、分化度、腫瘍最大径、腫瘍発生部位、年齢、および性別について核DNA量との関連を検討した。原発巣のみの検討では、末梢発生腫瘍にA型が有意に多くみられたのみで、他の因子と原発巣核DNA倍体様式には有意な関連を認めなかった。徳井ら<sup>46)</sup>も腺癌133例の検討で性別・病期別には有意差を認めなかったと報告している。しかし、転移巣核DNA量も考慮した結果、術後病期の進行やN因子(リンパ節転移)の増大にともないT-A型が有意に増加した。これは腫瘍の進展にともないA型細胞が測定上、有意な細胞群を形成したことを意味し、後述の予後との関連でも注目される。また、T因子や腫瘍最大径自体がDNA倍体様式やDIと全く関連を認めな

かったことも山岡ら<sup>41)</sup>の報告と同結果であり、腫瘍細胞核 DNA 量が増殖速度や局所浸潤能よりも転移能とより深く関連していることを示唆し興味深い。このことは今後の各種増殖関連抗原を用いた悪性度評価にて明かとなる可能性があり期待される。

縦隔リンパ節転移陽性肺癌症例の予後は一般に不良であり、手術適応には議論が多い<sup>50)</sup>。非小細胞進行肺癌に対する有効な非観血的治療法がない今日、本邦では外科的切除が治療の主体となっており、相対的治療切除を目指した積極的な縦隔リンパ節郭清が行われている<sup>25)</sup>。実際、N<sub>2</sub>症例であっても長期生存する症例があり、その予後良好因子を臨床病理学的に検討することは重要である。この点に関して癌細胞個々の悪性度の点から検討した報告はなく、今回N因子と有意な関連を認めた全腫瘍細胞核 DNA 量についてさらに詳細に検討した。転移リンパ節レベル数で全腫瘍細胞核 DNA 量を比較すると、肺内・肺門リンパ節も含め、3レベル以上のリンパ節転移を認めた89例で T-D 型を示したのは3例のみで、さらに5レベル以上の転移を認めた例は全例 T-A 型であった。後述のようにA型細胞の出現が潜在的遠隔転移巣の存在を示す可能性があり、積極的な縦隔リンパ節郭清により治療切除と判断されても多数のレベルの転移を認めた場合は特に慎重な経過観察が必要と思われた。さらに N<sub>2-3</sub>と判定された151例の肺内・肺門リンパ節転移レベル数の検討では、T-D 型は有意に転移レベル数が少なかった。すなわち、T-D 型には肺内・肺門リンパ節転移陰性で縦隔リンパ節転移を認める、いわゆるスキップ転移が多いことが示唆された。臨床的にもスキップ転移を認めるものは予後良好傾向にあるとの報告があり<sup>52)</sup>、生物学的悪性度の点からもこのことが示された。最近、肺癌腫瘍細胞核 DNA 量の術中迅速測定結果を縮小手術の可否判定に応用する試みが検討されているが、原発巣の一部がD型を示しても原発巣の他の部位やリンパ節微小転移巣でA型細胞を認める可能性があること、および T-D 型のリンパ節転移にはスキップ転移が多いことを考慮すると、その適応には十分な配慮が必要であると思われる。

核 DNA 量と生存率とを検討した結果、原発巣核 DNA 量のみでの検討でも、D型がA型に比べ有意に予後良好であった。サンプリング法や症例数、対象条件にさまざまな相違があるため他の報告と単純に比較できないが、Velde ら<sup>53)</sup>や Bunn ら<sup>42)</sup>が予後とは関連を認めなかったとしている以外、D型がA型に比べ予後良好とする報告が多い<sup>8,9)17,37)41)45)47)</sup>。しかし、300例以上の肺癌症例で核 DNA 量の予後因子としての意義を報

告したものはこれまでになく、全体で有意差を認めても、III期例以上で有意差を認めたとする報告は Volm らによる扁平上皮癌症例を対象とした検討のみである<sup>39)</sup>。これはいずれの報告も転移巣の存在を全く考慮していないことによる可能性がある。事実、腺癌の縦隔リンパ節転移陽性例のみの検討にて原発巣核 DNA 量による予後の相違を認めたとする報告はなく、今回の検討で腺癌の多い末梢発生例でより高頻度に原発巣・転移巣間の核 DNA 量の相違が観察されたことと関連するものと思われる。術後病期別に核 DNA 量による生存率の差異を検討した結果、I 期例では有意差を認めたが、III期例154例の原発巣のみの検討では統計学的有意差を認めなかった。転移巣の核 DNA 量も加味した結果、腫瘍巣全体がD型と判定された T-D 型は49例 (15.8%) で、III期例に限ると151例中14例、9.3%のみであった。しかし、この14例は、原発巣または転移巣にA型細胞の出現を認めた137例より有意に予後良好で、さらにこの14例はI、II期のA型例と比べても予後良好であった。このことからIII期症例の中に生物学的悪性度指標の点から比較的良好な予後が期待できる一群が少数ながら存在することが示された。

核 DNA 量がIII期症例でも有意な予後因子であることが示されたが、肺癌手術例全体の中で独立した予後因子となりうるかについて多変量解析を用いて検討した。近年、予後因子の検討に多変量解析を用い、予後に対する各因子の影響を補正した形でその独立性を評価した報告が散見される<sup>40)44)</sup>。Cox の比例ハザードモデル<sup>21)</sup>では重回帰分析では取り扱えなかった観察途中症例や消息不明症例の観察期間 (生存確認期間) を死亡確率の計算に含めることができ、実際の患者の経過に近い状態で各要因の関与を検討することが可能となった。また、予後因子の寄与の程度をハザード比と呼ばれる相対的な死亡確率で表現することで各因子の影響が理解しやすくなった。本来、関連各因子を揃えた比較では症例数が少なくなってしまうという問題があり、これを補う意味で本法は有用な解析手段として広く利用されるようになったが、症例数が少なくなると、同時に解析する予後因子 (変量 variable) 間の相関の影響が無視できなくなるという欠点もある。すなわち、少数例を対象に、互いに相関の強い多数の変量を用いて解析を行うと数例の生存状況に偶然影響されやすくなってしまう<sup>22)</sup>。これまでの検討から核 DNA 量はかなり有意な予後因子であることが期待されるが、実際、D型と判定される症例数は少なく、多数の因子を同時に解析しようとするとその相関の強さゆえ、



誤った結論を導き出す可能性もある。そのため、今回はあらかじめ各因子間の相関について十分検討し、その上で共変量とする因子を決定した。最終的には核 DNA 量に関する各因子のひとつを TNM 各因子、年齢、性別に加え、これら共変量の影響を除外した上での予後因子としての有用性について検討した。Volm<sup>39)</sup>も Cox の比例ハザードモデルを用いた105例の肺扁平上皮癌の予後因子の検討で相関関係のある因子を共変量とすることの問題に言及し、核 DNA 量に関する因子のひとつと臨床病理所見のひとつづつを交互に解析した上で、それぞれが独立した予後因子であることを示している。一方、山岡ら<sup>40)</sup>はそれぞれ強い相関があると思われる TNM 因子と術後病期や切除根治度、性別と組織型、さらに DNA 倍体様式と DI をすべて同時に多変量解析し、核 DNA 量の予後因子としての有用性を指摘しているが解析方法にやや疑問が残る。今回の検討では、原発巣のみの DNA 倍体様式も独立した予後因子と判定されたが、転移巣についても検討した全腫瘍巣核 DNA 倍体様式がよりハザード比が大きい予後因子であった。また、DNA 倍体様式のほか、その DI の大きさについても検討したが、転移巣も含めた全腫瘍巣内の最大 DI が独立した予後因子となりうることを示されたものの、そのハザード比は原発巣の DNA 倍体様式のものよりも低値であり、原発巣の最大 DI は有意な予後因子とはなりえなかった。DI が2.0を超える症例はそれ以外に比べ予後不良であったとする報告もあり<sup>39)</sup>、今後の検討がさらに必要である。共変量として解析できなかったさまざまな背景因子別に対象症例を制限し、その影響を補正した上で検討しても全腫瘍巣核 DNA 倍体様式は独立した予後因子であることが示された。一方、原発巣のみの倍体様式は非治癒切除例やリンパ節転移陽性例に限定すると予後因子としてのハザード比が低く、この結果からも転移巣について解析検討することが重要であると考えられた。

以上より、原発巣あるいは転移巣内に A 型細胞群が出現したものは予後不良であることが示されたが、どのような原因が関与しているのかを明確に示した報告はない。A 型には脈管侵襲陽性例が多く、そのため潜在的遠隔転移がすでに存在している可能性が高いとする報告はあるが<sup>41,45)</sup>、脈管侵襲の機序そのものとの関係についての検討はない。また、DNA 倍体様式別に S 期細胞群の比率を検討した報告では、A 型で有意に高い増殖能が示されている<sup>50)</sup>。しかし、今回の検討でも明かなように DNA 倍体様式と腫瘍の大きさには有意な相関がなく、A 型の予後に直接影響しているのは

腫瘍増大速度が速いことよりもむしろ、リンパ節転移や遠隔転移の成立機序に直接関与するものである可能性が高い。A 型細胞が原発巣から離脱しやすいということは脈管侵襲陽性例が多いという観察結果からも推測されるが、原発巣離脱後、宿主生体の免疫機能の影響、転移巣形成過程における生着能や浸潤能、転移部位での増殖能などさまざまな点について、基礎的研究の成果との対比が必要となるであろう。

今回、核 DNA 量と術後再発部位の関係を検討した結果、D 型例の再発の多くが血行性肺転移も含めた胸郭内であった。脳、肝、骨などへの遠隔転移の成立が核 DNA 量の増加と関連している可能性が示唆されるが、この点について臨床的に検討した報告はなく、術後の経過観察という臨床面や転移成立の基礎的研究面で大変興味深い。これらの事実は今後、肺癌治療方針の決定、予後の予測、再発後の治療など肺癌診療に大きく貢献しうるものと期待される。

## 結 論

原発性非小細胞肺癌318例を対象に、フローサイトメトリー法を用いて原発巣腫瘍細胞核 DNA 量および転移巣腫瘍細胞核 DNA 量を測定し、その測定結果と臨床病理学的所見および予後との関連を検討し以下の結論を得た。

1. 核 DNA 量の測定は原発巣の98.4%、転移巣の97.8%で可能であった。

2. 原発巣の核 DNA 量は臨床病理学的所見と有意な相関を認めなかった。原発巣が DNA 二倍体腫瘍であったのは78例 (24.9%) で、これは異数倍体腫瘍であった235例 (75.1%) に対し有意に予後良好であった。

3. 原発巣とその転移巣の核 DNA 量を比較した結果、原発巣が DNA 二倍体腫瘍であった78例中29例で転移巣内に異数倍体腫瘍細胞を認めた。また、縦隔リンパ節転移陽性例125例で原発巣と転移巣の最大 DNA 指標を比較した結果、相関係数  $r = 0.1057$  であり原発巣では認められない腫瘍細胞群が転移巣に出現する可能性が高かった。

4. 転移陽性リンパ節レベルが5レベル以上の症例では全例、原発巣または転移巣に異数倍体腫瘍細胞の存在を認めた。

5. 原発巣または転移巣に異数倍体腫瘍細胞を認める261例は原発巣・転移巣のすべてが二倍体腫瘍であった49例に対し有意に予後不良であった。

6. Cox の比例ハザードモデルを用いて核 DNA 量の予後因子としての独立性を検討した結果、原発巣ま

たは転移巣に異数倍体腫瘍細胞の存在を認めることが他の臨床病理学的所見とは独立した予後因子であることが示された。

7. 核 DNA 量は術後再発部位と有意な関連のあることが示され、今後さまざまな臨床的利用が可能であることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師岩 喬教授に深甚なる謝意を表します。また、直接の御指導を頂きました渡辺洋字助教授、統計学的処理に関しまして御教示を仰ぎました本学衛生学教室橋本和夫教授に深謝致します。さらに本研究の遂行に際し、御協力を頂きました第一外科肺グループの諸先生、技師、および関係各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第43回日本胸部外科学会総会 (1990, 東京)、第31回日本肺癌学会総会 (1990, 東京) において発表した。

## 文 献

- 1) 渡辺洋字, 清水淳三, 村上真也, 木元春生, 市橋匠, 吉田政之, 小田 誠, 坪田 誠, 岩 喬: 教室における肺癌手術例の年代別にみた手術術式の変遷とその成績の比較. 日胸外会誌, 38, 867-870 (1990).
- 2) Watanabe, Y., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, S. Tatsuzawa, Y., Iwa, T., Suzuki, M. & Takashima, T.: Aggressive surgical intervention in N2 non-small cell cancer of the lung. Ann. Thorac. Surg., 51 (1991), in press.
- 3) 大田満夫: 肺癌治療における日本の現状. 手術, 44, 1345-1351 (1990).
- 4) 渡辺洋字, 佐藤日出夫, 飯田茂穂, 小林弘明, 木元春生, 市橋 匠, 清水淳三, 村上真也, 岩 喬: 肺癌長期生存例の臨床背景因子の検討による外科療法の再評価. 日胸外会誌, 37, 878-879 (1989).
- 5) 服部 信, 小山靖夫編: 図説臨床肺癌シリーズ, no. 34, 癌の病期分類. 第1版, 33-75 頁, メジカルビュー社, 東京, 1990.
- 6) 日本肺癌学会編: 臨床・病理, 肺癌取扱規約. 改訂第3版, 15-115 頁, 金原出版, 東京, 1987.
- 7) Sahin, A. A., Ro, J. Y., El-Naggar, A. K., Lee, J. S., Ayala, A. G., Teague, K. & Hong, W. K.: Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. Cancer, 65, 530-537 (1990).
- 8) Volm, M., Hahn, E. W., Mattern, J., Muller, T., Vogt-Moykopf, I. & Weber, E.: Five-year follow-up study of independent clinical

and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma. Cancer Res., 48, 2923-2928 (1988).

9) Isobe, H., Miyamoto, H., Shimizu, T., Haneda, H., Hashimoto, M., Inoue, K., Mizuno, S. & Kawakami, Y.: Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. Cancer, 65, 1391-1395 (1990).

10) Kalioniemi, O., Punnonen, R., Mattila, J., Lehtinen, M. & Koivula, T.: Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. Cancer, 61, 334-339 (1988).

11) Costello, F., Mason, B. R., Collins, R. J. & Kearsley, J. H.: A clinical and flow cytometric analysis of patients with nasopharyngeal cancer. Cancer, 66, 1789-1795 (1990).

12) Smit, V. T., Fleuren, G. J., van Houwelingen, C., Zegveld, S. T., Kuipers-Dijkshoorn, N. J. & Cornelisse, C. J.: Flow cytometric DNA-ploidy analysis of synchronously occurring multiple malignant tumors of the female genital tract. Cancer, 66, 1843-1849 (1990).

13) Kute, T. E., Muss, H. B., Cooper, M. R., Case, L. D., Buss, D., Stanley, V., Gregory, B., Galleshaw, J. & Booher, K.: The use of flow cytometry for the prognosis of stage II adjuvant treated breast cancer patients. Cancer, 66, 1810-1816 (1990).

14) Carey, F. A., Lamb, D. & Bird, C. C.: Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. Cancer, 65, 2266-2269 (1990).

15) Volm, M., Mattern, J., Vogt-Schaden, M. & Wayss, K.: Flow cytometric analysis of primary lung carcinomas and their lymph node metastases. Anticancer Res., 7, 71-76 (1987).

16) Teodori, L., Tirindelli-Danesi, D., Mauro, F., De Vita, R., Uccelli, R., Botti, C., Modini, C., Nervi, C. & Stipa, S.: Non-small-cell lung carcinoma, tumor characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. Cytometry, 4, 174-183 (1983).

17) Tirindelli-Danesi, D. Teodori, L., Mauro, F., Modini, C., Botti, C., Cicconetti, F. & Stipa, S.: Prognostic significance of flow cytometry in

- lung cancer. *Cancer*, **60**, 844-851 (1987).
- 18) Schutte, B., Reynders, M. J., Bosman, F. T. & Blijhan, G. H.: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry*, **6**, 26-30 (1985).
- 19) Vindeløv, L. L., Christensen, I. J. & Nissen, N. I.: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flowcytometric DNA analysis. *Cytometry*, **3**, 323-327 (1983).
- 20) Kaplan, E. L. & Meier, P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Statist. Assoc.*, **53**, 457-481 (1958).
- 21) Cox, D. R.: Regression models and life-tables. *J. R. Statistics Soc. Series. B*, **34**, 187-220 (1972).
- 22) 浜島信之: 多変量解析による臨床研究. 第1版, 118-129 頁, 名古屋大学出版会, 名古屋, 1990.
- 23) 末舛恵一: 肺癌診療の進歩と展望. *臨床医*, **16**, 1770-1771 (1990).
- 24) 児玉哲郎: 病理学的にみた肺癌の多様性と予後. 癌と化学療法, **12**, 45-53 (1985).
- 25) 君塚五郎, 林 豊: 肺癌の病理組織学的検討. *肺癌*, **19**, 167-176 (1979).
- 26) Takise, A., Kodama, T. & Shimosato, Y.: Histologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2cm in diameter. *Cancer*, **61**, 2083-2088 (1988).
- 27) Seckinger, D., Sugarbaker, E. & Frankfurt, O.: DNA content in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **113**, 619-626 (1989).
- 28) Tjio, J. H. & Levan, A.: The chromosome number of man. *Hereditas*, **42**, 1-8 (1965).
- 29) Hedley, D. W., Friedlander, M. L. & Taylor, I. W.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1333-1335 (1983).
- 30) Sasaki, K., Hashimoto, T., Kawachino, K. & Takahashi, M.: Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer*, **62**, 2569-2575 (1988).
- 31) Quirke, P., Dyson, J. E. D., Bird, C.C. & Joslin, C. A. F.: Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br. J. Cancer*, **51**, 99-106 (1985).
- 32) Kokal, W. A., Duda, R. B., Azumi, N., Sheibani, K., Kemeny, M. M., Terz, J. J. & Harada, J. R.: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Arch. Surg.*, **121**, 1434-1439 (1986).
- 33) Yamamoto, M., Oda, N. & Tahara, E.: DNA ploidy patterns in gallbladder adenocarcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **20**, 83-86 (1990).
- 34) Erba, Ubezio, P., Pepe, S., Vaghi, S., Mersoni, S., Torri, W., Mangioni, C., Landoni, F. & D'Incalci, M.: Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancers. *Br. J. Cancer*, **60**, 45-50 (1989).
- 35) Cooke, L. D., Cooke, T. G., Bootz, F., Forster, G., Helliwell, T. R., Spiller, D. & Stell, P. M.: Ploidy as a prognostic indicator in end stage squamous cell carcinoma of the head and neck region treated with cisplatin. *Br. J. Cancer*, **61**, 759-762 (1990).
- 36) 梅原靖彦, 宮原 透, 吉田雅行, 大場範行, 松田寿夫, 後藤秀樹, 原田幸雄: 胃癌の肺転移例における癌細胞核 DNA 量の検討. 癌の臨床, **36**, 469-472 (1990).
- 37) Volm, M., Drings, P., Mattern, J., Sonka, J., Vogt-Moykopf, I. & Wayss, K.: Prognostic significance of DNA patterns and resistance-predictive test in non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, **56**, 1396-1403 (1985).
- 38) Zimmerman, P. V., Hawson, G. A. T., Bint, M. H. & Parsons, P. G.: Ploidy as a prognostic determinant surgically treated lung cancer. *Lancet*, **2**, 530-533 (1987).
- 39) Volm, M., Mattern, J., Muller, T. & Drings, P.: Flow cytometry of epidermoid lung carcinomas, relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five-year follow up study. *Anti-cancer Res.*, **8**, 105-112 (1988).
- 40) Lipford, E. H., Sears, D. L., Eggleston, J. C., Moore, G. W., Lillemoe, K. D. & Baker, R. R.: Prognostic factors in surgically resected limited-stage, non-small cell carcinoma of the lung. *Am. J. Surg. Pathol.*, **8**, 357-365 (1984).
- 41) 山岡憲夫, 内山貴堯, 君野孝二, 赤嶺晋治, 松尾 聡, 辻 浩一: 多変量解析を用いた肺癌の核 DNA 量の予後因子としての有用性. 日外会誌, **91**, 1608-1616 (1990).

- 41) Bunn, P. A., Carney, D. N., Gazdar, A. F., Whang-Pang, J. & Matthews, M. J.: Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res.*, **43**, 5026-5032 (1983).
- 43) Kallioniemi, O.: Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intra-tumor heterogeneity. *Cytometry*, **9**, 164-169 (1988).
- 44) Ljungberg, B., Stenling, R. & Roos, G.: DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer*, **56**, 503-508 (1985).
- 45) 徳井俊也, 水元 亨, 草川 均, 木村 誠, 並河尚二, 草川 實, 矢谷隆一, 河野文昭: フローサイトメトリーによる肺腺癌の核 DNA 量解析. *日胸*, **49**, 469-475 (1990).
- 46) 羽田 均, 磯部 宏, 宮本 宏, 川上義和: 原発性肺腺癌の分化度. 組織型分類および細胞型分類と核 DNA 量との関係. *日本臨床細胞学会雑誌*, **28**, 477-482 (1989).
- 47) Shimosato, Y., Asamura, H., Yoshida, K., Noguchi, M., Nakajima, T. & Mukai, K.: Factors possibly affecting the degree of malignancy in adenocarcinoma of the lung. *Chest*, **96**, 37S-38S (1989).
- 48) 山岡憲夫, 田川 泰, 綾部公麿, 川原克信, 木田晴海, 内山貴堯, 富田雅夫: Flow cytometry を用いた肺癌の原発巣と転移巣の細胞内 DNA 量 RNA 量の検討. *日外会誌*, **91**, 901-906 (1990).
- 49) 力武 浩: 食道癌組織についての DNA ヒストグラムの解析. *日外会誌*, **91**, 564-574 (1990).
- 50) 新妻雅行, 中村治彦, 田口雅彦, 木下雅雄, 森山浩, 小高達朗, 平良 修, 於保健吉, 早田義弘: リンパ節転移を認める肺癌手術例の検討. *肺癌*, **30**, 195-201 (1990).
- 51) Watanabe, Y., Shimizu, J., Tsubota, M. & Iwa, T.: Mediastinal spread of metastatic lymph nodes in bronchogenic carcinoma. *Chest*, **97**, 1059-1065 (1990).
- 52) 岩本 勲, 柴田紘一郎, 松崎泰憲, 吉岡 誠, 枝川正雄, 前田正幸, 白間康博, 久保田伊知郎, 渋谷浩二, 高橋博和, 古賀保範: 原発性肺癌(腺癌・扁平上皮癌)の縦隔リンパ節飛石状転移の検討. *日呼外会誌*, **4**, 306-309 (1990).
- 53) Velde, G. P. M., Schutte, B. & Vermeulen, A.: Flow cytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**, 455-460 (1988).
- 54) Volm, M., Bak, M., Hahn, E. W., Mattern, J. & Weber, E.: DNA and S-phase distribution and incidence of metastasis in human primary lung carcinoma. *Cytometry*, **9**, 183-188 (1988).

**Clinical and Experimental Studies on Cellular DNA Content in Non-small Cell Lung Cancer,** Yoshinobu Hayashi, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. J. J. Med. Soc., **100**, 47 - 67 (1991)

**Key words** non-small cell lung cancer, cellular DNA content, heterogeneity, prognostic parameter, multivariate analysis

#### Abstract

The Cellular DNA contents of non-small cell lung cancer were studied in 318 resected specimens and a correlation between the DNA ploidy pattern and the prognoses of the patients was evaluated. The cellular DNA contents in 1,525 propidium iodide-stained paraffin-embedded specimens were measured by flow cytometry. To minimize the influence of intratumoral heterogeneity, tissue samples were taken from the whole cut surface of the primary tumor, at its largest diameter. The DNA content was classified into two categories by the DNA index (DI); diploid (DI=1.0) and aneuploid (DI≠1.0). When the DNA ploidy in primary tumors was analyzed in 313 cases, 78 (24.9%) were classified as having a diploid pattern, whereas 235 (75.1%) as aneuploid pattern. Furthermore, when the DNA

ploidy in the metastatic sites was measured, 29 out of the 78 cases which had a diploid pattern in the primary sites, showed an aneuploid pattern in the metastatic sites. The maximum DI in the primary tumor did not correlate with that in the metastatic tumor. These data suggests that a high incidence of heterogeneity between the primary and metastatic tumors exists. There was no significant correlation between the DNA ploidy of the primary tumors and the clinico-pathologic factors, such as age, sex, tumor size, stage, TNM categories, histological cell type, or tumor cell differentiation. When the survival rates were compared with the ploidy pattern of the primary tumor, patients in the early stages of cancer with diploid tumors showed a significantly better survival rate than those with aneuploid tumors. However, in patients in the advanced stage, the ploidy pattern of the primary tumor did not correlate well with their prognoses. Instead, when the ploidy pattern in the metastatic tumor was analyzed, the patients with an aneuploid tumor in the metastatic site showed a worse survival rate than those with a diploid tumor in both the primary and metastatic sites. These facts suggest that measurements of the DNA content from both in the primary and metastatic sites are indispensable from the clinical point of view. Cox's multivariate analyses clarified that DNA ploidy was a significant prognostic parameter. The initial recurrent site of diploid tumors studied were almost always located within the thoracic cavity, whereas the aneuploid tumors were mostly in the distant organs. In conclusion, the flow cytometric analyses of cellular DNA content provide useful biological parameters in evaluating the malignancy of lung cancer. As heterogeneity between primary and metastatic tumors exists, multiple sampling is required to obtain a more precise analysis.